

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

発達期における統合的な遅発性神経毒性試験法の開発

研究分担者

豊橋技術科学大学 環境・生命工学系
吉田 祥子

要旨

化学物質に対して感受性の高いラット小脳皮質を用いて、化学物質曝露による神経突起進展、神経回路形成、行動への影響を検討し、最も適切な定量化方法を決定することを目的として実施した。評価物質としてバルプロ酸、クロルピリホス、SAHA、MS-275、有機スズ、グリホサートについて、神経細胞レベルおよび小脳組織レベルでの変化を観察し、定量化を試みた。さらにバルプロ酸について、投与時期と投与濃度を変化させその効果を検討した。化学物質投与による神経伸長変化の定量化、小脳虫部第一裂の過剰な褶曲の定量化、行動観察の定量化を行った。その結果、遅発性神経毒性が考えられる化学物質であるバルプロ酸が、生後の神経回路発達の変化を小脳神経細胞の突起伸展と小脳構造の変化、動物の行動変化を引き起こすことを定量的に示した。これにより投与量依存性、投与時期依存性が明瞭になり、さらに遺伝子レベル、たんぱく質レベルでの発達期神経毒性の定量化につなげることが期待される。

A. 研究目的

遅発性神経毒性を予想される化学物質は多数あるが、その各々を毒性試験することは難しい。本研究では、いくつかの発達期神経毒性を予想される化学物質について、実験動物の神経回路発達期、神経形成期、成熟期の各時期で観察される現象を観察し、各化学物質の神経毒性予測について、動物実験から *in vitro* 研究への橋渡しを図ることを目的とする。

主たる研究対象の化学物質には、バルプロ酸(VPA)を用いた。さらに、VPA の作用機序として予想されているヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害効果を持つ化学物質の、スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)、トリコスタチン(TSA)、MS-275 を観察した。VPA の結果と比較するため、クロルピリホス(CPF)、リポポリサッカライド(LPS)、および環境毒性物質のトリブチルスズ(TBT)、グリホサート(GLY)投与を観察した。これら化学物質を用いて、小脳発達に与える影響を、以下の方法で観察した。①免疫組織化学的手法による神経の形態的变化、②ヘマトキシリン-エオシン染色(HE 染色)による小脳虫部全体の構造変化③個体の行動に及ぼす変化を確認するために発達期と成熟期の個体の行動観察、④光学測定法による伝達物質放出の変

化。

B. 研究方法

各化学物質を妊娠 16 日（プラグ確認日を妊娠 1 日とする）のラットに下記のように投与した。200~600 mg/母体kgの VPA(経口)、50mg/kg の SAHA(腹腔内)、4mg/kg の MS-275(経口)、5mg/kg の CPF(経口)、1mg/kg の TSA(経口)、100 μ g/kg の LPS(腹腔内)、20mg/kg の TBT(経口)、250mg/kg の GLY(経口)をそれぞれ投与した。VPAについては、妊娠 14 日、18 日にそれぞれ 600 mg/kgの投与することを試験した。

各投与動物を生後の各時期で灌流固定後、小脳虫部の矢状面スライス进行调整し、抗カルビンジン抗体染色によってプルキンエ細胞の樹状突起長を測定し、化学物質投与による神経伸長変化の定量化を行った。さらにスライス全体を HE 染色し、小脳虫部スライスの第 V/VI 小葉間にある primary fissure（第一裂）について、プルキンエ層の長さとの比を計算し、投与動物と対照動物を比較して化学物質投与の影響の定量化を行った。また各投与動物の発達期（生後 4 日から 10 日）および成熟期（生後 6 週から 8 週）で行

動試験を行った。発達期では震えのような不随意運動の出現率を計測、成熟期では新規環境での行動を計測し定量化を行った。さらに生後10日から21日の小脳皮質層からの伝達物質放出を、酵素光学測定法を用いて観察した。

C. 研究結果

1. 神経回路発達期（生後2週：PW2）の変化

VPA投与動物では、プルキンエ細胞の樹状突起伸長が対照動物より早く著しく、生後2週で1.9倍、生後3週でも1.3倍の伸長を示した（結果1）。突起伸長の加速と同時に、プルキンエ細胞のプログラム細胞死が引き起こされず、単層化しないプルキンエ細胞層が観察された。樹状突起は複雑な網状の形状を示し、主たる垂直突起（apical dendrite）が識別できない状態を示した。

さらに、VPA投与動物では、小脳虫部第一裂（V葉-VI葉間）に過剰な褶曲が観察された。これを定量化するために、プルキンエ層の長さ（深さ）の比をとって定量化を試みた（結果2-1）。これにより、プルキンエ層が褶曲によって長くなり、対照動物の1.2倍の長さのプルキンエ層を持つことが示された。この変化はVPAの投与量に正の相関を示した（結果2-2、2-3a）また、妊娠14日にVPAを投与した動物では1.25倍のプルキンエ層が観察されたが、妊娠18日投与動物は対照動物と差を示さなかった（結果2-3b）。投与期依存性があり、また妊娠途絶が少ないことから、以降の実験は妊娠16日投与とした。

プルキンエ細胞の変化は、SAHA投与動物でも観察されたが、MS-275投与動物、TBT投与動物では明らかではなかった（結果3-1）。小脳虫部第一裂の過剰な褶曲は、SAHA投与動物で対照動物の1.1倍、CPF投与動物では1.05倍のプルキンエ層を示した。VPAに比べると、各化学物質の褶曲は小さく、TSAで1.05倍、LPSで1.09倍で出現にばらつきがあった。一方MS-275、TBT、GLY投与動物では変化が観察されず、神経突起伸展異常と同様の傾向を示した。

VPA投与動物と同様に、CPF投与動物、MS-275投与動物ではプルキンエ細胞の過剰な分布が観察されたが、LPS投与動物、GLY投与動物

物ではプルキンエ細胞のプルキンエ層からの欠損が観察された。

2. 神経形成期（PW1）の変化

発達期の変化が出生後の早い時期から出現しているのではないかと考え、VPA投与動物における生後1週間の小脳での分化誘導因子ReelinとBDNFの発現を見た。VPA投与動物では生後早い段階で、小脳分子層にReelinが分布し、これが神経回路の異常を誘発することが示唆されたが、BDNF量には差異はなく、これを介さないメカニズムが示唆された（結果4）。

この時期の行動観察の結果、VPA投与動物では、初期に多くの不随意運動を確認したが、成長につれて減少する傾向があった。SAHA投与動物では、多くの不随意運動を確認し、且つ成長につれて増加する傾向が見られた。MS-275投与動物では若干の増加が確認されたが、著しい変化は確認できなかった。TBT投与動物では、多くの不随意運動を確認し、また、成長につれて不随意運動が増加する傾向にあった（結果5）。

3. 成熟期の行動変化（PW6以降）

VPA投与動物は、PW6以降の成熟期の行動において、新規環境でも警戒が少なく、過活動の傾向を示した（結果6-1）。移動速度は速く、躊躇なく中心部を通過し、対照動物との差異が見られた。一方社会的行動、対物的行動では、強い警戒心を示してフリーズする様子が観察され、ADHD様の行動が見られた（結果6-2、6-3）。

CPF投与動物、TSA投与動物の行動を、VPA投与動物と比較すると、VPAと同様にCPFを投与された動物は、VPA投与動物のような衝動性を示さず、むしろ探索行動を減少し硬直する傾向がみられ、行動異常を示しているのではないかと考えられる。VPAと同様のHDAC阻害剤であるTSA投与動物では、異なる点はあるもののVPA投与動物と類似したADHD状の行動を示した（結果6-4）。

4. 伝達物質放出の変化

VPA投与動物、SAHA投与動物では、発達期に過剰な伝達物質の放出が観察された（結果7a）。グルタミン酸誘発性のATP放出は、グリア細胞からのシナプス形成誘発因子と考えられており、ATP受容体の阻害によってシナプス

形成は著しく抑制される。VPA投与動物、SAHA投与動物ではグルタミン酸誘発性ATP放出が発達初期から亢進しており、何らかのグリア細胞性の異常が起こっていることを示唆した。神経回路が成熟してくる生後21日では、AMPA刺激で誘発されるグルタミン酸放出が、対照動物では周辺の細胞を連続的に刺激するのに対し、VPA投与動物では単発的で広がり少なく、神経伝達物質の取り込みなどに変化が生じていることをうかがわせた(結果7b)。

D. 考察

研究結果を通じ、発達期小脳皮質の形成異常、プルキンエ細胞の形成異常、伝達物質放出の異常によって化学物質の神経毒性の定量化の可能性を示した。発達期神経系におけるこれらの変化は、成熟期では個体の行動異常につながることを確認できた。神経細胞の変化を引き起こす発生制御たんぱく質、神経栄養因子などの発現変異を示唆しているものと考えられる。これらの神経回路レベル、行動レベルでの変化を細胞レベルの変化につなげることが必要と考えられる。

E. 結論

本研究において、遅発性神経毒性の懸念が想定される化学物質としてバルプロ酸、クロルピリホスを胎生期の動物に投与し、生後の神経回路発達の変化を小脳神経細胞の突起伸展と小脳構造の変化、動物の行動変化から定量化して示した。さらに、各種の動態を持つ化学物質を投与し、小脳における変化を観察した。定量化により投与量依存性、投与時期依存性が明瞭になり、さらに遺伝子レベル、たんぱく質レベルでの発達期神経毒性の定量化につなげることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Mabuchi H., Ong HY., Watanabe K., Yoshida S., Hozumi N. "Visualization of Spatially Distributed Bioactive Molecules Using Enzyme-Linked Photo Assay." IEEJ Trans. Fund. Materials (2016) 136(2):99-104
- [2] Fueta Y., Sekino Y., Yoshida S., Kanda Y., Ueno S. "Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat

hippocampus." NeuroToxicology (2018) 65: 1-8

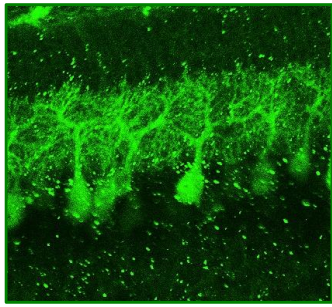
- [3] Yamada S, Kubo Y, Yamazaki D, Sekino Y, Nomura Y, Yoshida S. Kanda Y. Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells. Scientific Reports (2018) 8:12155

2. 学会発表

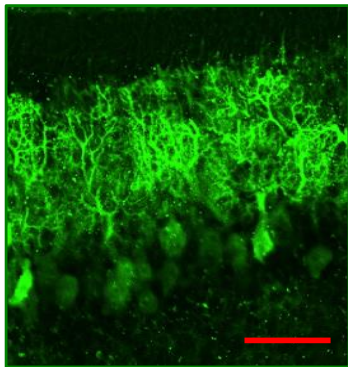
- [1] 富田達朗, 岩本早起, 笛田 由紀子, 上野晋, 関野祐子, Roman Maev, 穂積直裕, 吉田祥子, Alteration of cerebellar lobules in Valproate-induced autistic model rat. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016
- [2] 西川ちひろ, 高橋信人, 富田達朗, 重本-最上由香里, 佐藤薫, 関野祐子, 馬淵光, 穂積直裕, 吉田祥子, Interaction between neurosphere and cultured glial cell. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016
- [3] 三上哲理, 渡邊一徳, 笛田 由紀子, 上野晋, 関野祐子, 穂積直裕, 吉田祥子, Fast glutamate release detection in normal and valproate-administrated rat cerebellum. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016
- [4] 高橋信人, 馬淵光, 重本-最上由香里, 佐藤薫, 関野祐子, 穂積直裕, 吉田祥子, Visualization of neurotransmitter release in the developing neurosphere cells using the enzyme-linked photo-assay. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016
- [5] 中嶋さりい, 富田達朗, 笛田 由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子, Alteration of neuronal development by Autism-induce drugs and recovery effects with bumetanide in developing rat cerebellum. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016
- [6] H. Mabuchi, N. Takahashi, K. Sato, Y. Sekino, N. Hozumi, S. Yoshida, Visualization of neurotransmitter released from cultured granule cells and the neurosphere cells using enzyme-linked photo-assay combined with ICA. 46th Neuroscience meeting, San Diego, 2016
- [7] S. Nakajima, T. Tomida, K. Ikai, Y. Fueta, S. Ueno, N. Hozumi, Y. Sekino, S. Yoshida, Alteration of Purkinje cells by autism-inducing drugs, and recovery effects with bumetanide or oxytocin administration in developing rat cerebellum. 46th Neuroscience meeting, San Diego, 2016
- [8] 佐藤誠太, 中嶋さりい, 笛田 由紀子, 上野晋, 関野祐子, 吉田祥子, 抗てんかん薬バルプロ酸の曝露期・曝露濃度による発達期神経毒性の変化, 第47回中部化学関係学協

- 会連合会秋季大会, 豊橋, 2016
- [9] Yoshida S., Hozumi N., Fueta Y., Ueno S., Sekino S. Society of Toxicology, 55th Annual Meeting. New Orleans, USA (2016)
- [10] Yoshida S. Neuroscience meeting 2017, nanosymposium. Washington DC, USA (2017)
- [11] Yoshida S. 第 60 回日本神経化学会大会 シンポジウム 仙台 (2017)
- [12] Yoshida S., Fueta Y., Ueno S., Hozumi N., Sekino Y., Kanda Y. 10th DOHaD world congress. Rotterdam, Nederland (2017)
- [13] Yoshida S., Rahayu RH., Takanashi K., Kishikawa K., Kurita H., Takashima K., Hozumi N., Kobayashi K., Yamamoto S. 5th Joint Meeting of the Acoustical Society of America and the Acoustical Society of Japan. Waikiki, USA (2016)
- [14] Yoshida S., Hozumi N., Fueta Y., Ueno S., Sekino S. Society of Toxicology, 55th Annual Meeting. New Orleans, USA (2016)
- [15] Fueta Y., Sekino Y., Yoshida S., Kanda Y., Ueno S. "Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus." *NeuroToxicology* (2018) 65: 1-8
- [16] Yoshida S., Iwamoto S, Fueta Y, Ueno S, Y. Sekino Y, Nomura Y, Kanda Y. The malformation of Purkinje cells becomes the sensing tool for developmental neurotoxicity; its potential and limitation. EUROTOX 2018, oral session. Brussel (2018)
- [17] Yoshida S., Hozumi N, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y. Microglia activation related to neuronal malformation in developing cerebellar cortex of drug-induced autistic model rat. Keystone symposia: New Frontiers in Neuroinflammation. Keystone (2018)
- [18] Tiong TKS, Nishikawa C, Fueta Y, Ueno S, Sekino Y, Kanda Y, Nomura Y, Yoshida S. Altered gut microbiota observed in valproate-administrated autistic model rats. 第 97 回日本生理学会大会
- 他 20 件
- H. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許・特許出願
- [1] 吉田祥子, 穂積直裕, 氏家雅彦, 須山洋行, 光学観察装置、光学観察方法、標本観察画像の画像処理プログラム, 特許番号: 6295396
- [2] 吉田祥子、細胞放出物質検出装置、細胞放出物質検出方法及び細胞放出物質検出用固定化酵素基板 特許 5871224
3. 実用新案登録
なし。
4. その他
なし。

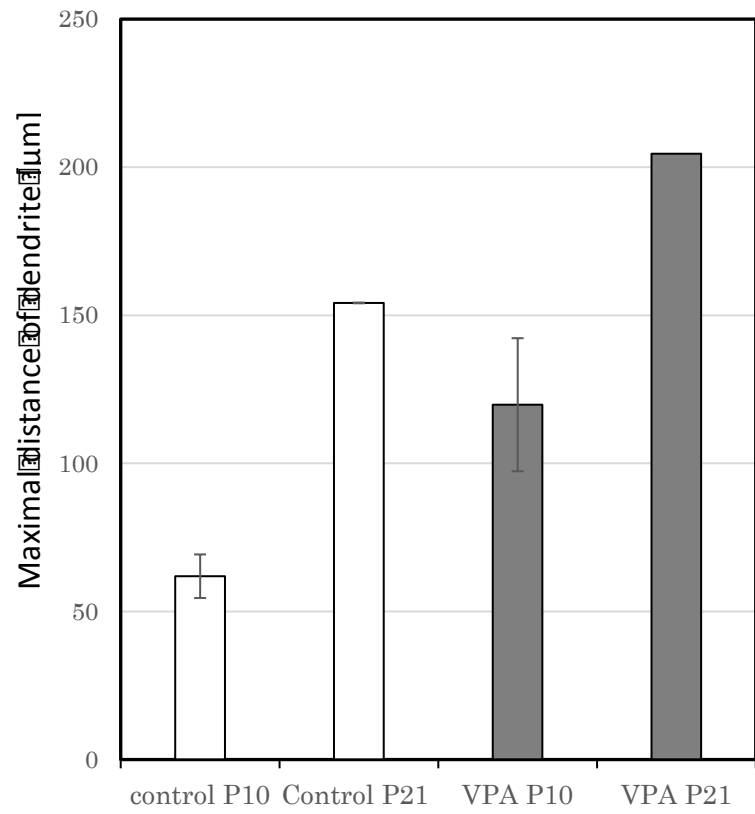
結果 1



生後10日の対照口物のプルキンエ細胞

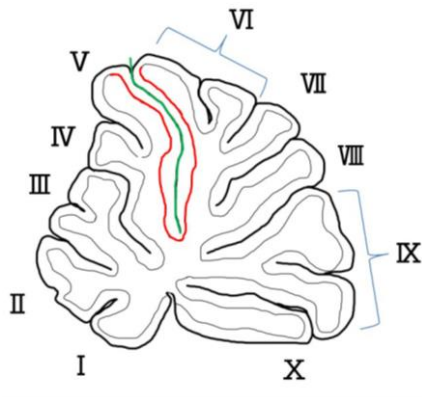


生後10日のVPA投与口物のプルキンエ細胞
(抗カルビンジン D-28k染色)



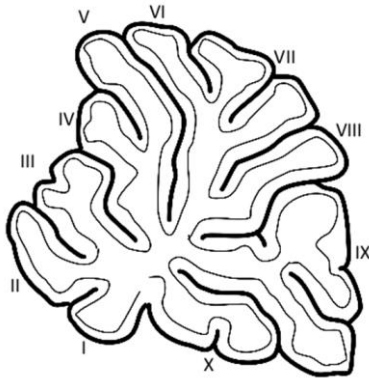
結果 2

2-1 小葉褶曲の定量方法

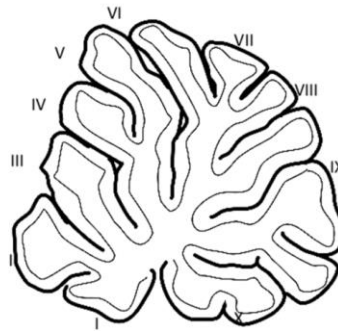


$$\text{Folding ratio} = \frac{\text{Length of PL}}{\text{Depth of gyrus}}$$

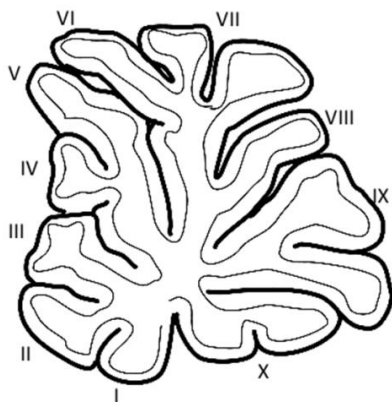
2-2 各条件で VPA を投与した動物の小脳虫部の褶曲構造の変化



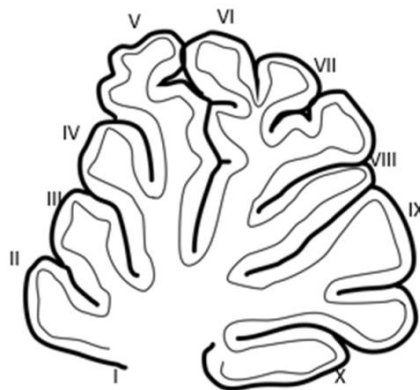
生後 16 日 対照動物小脳



VPA 200 mg/kg 投与動物小脳 (P15)



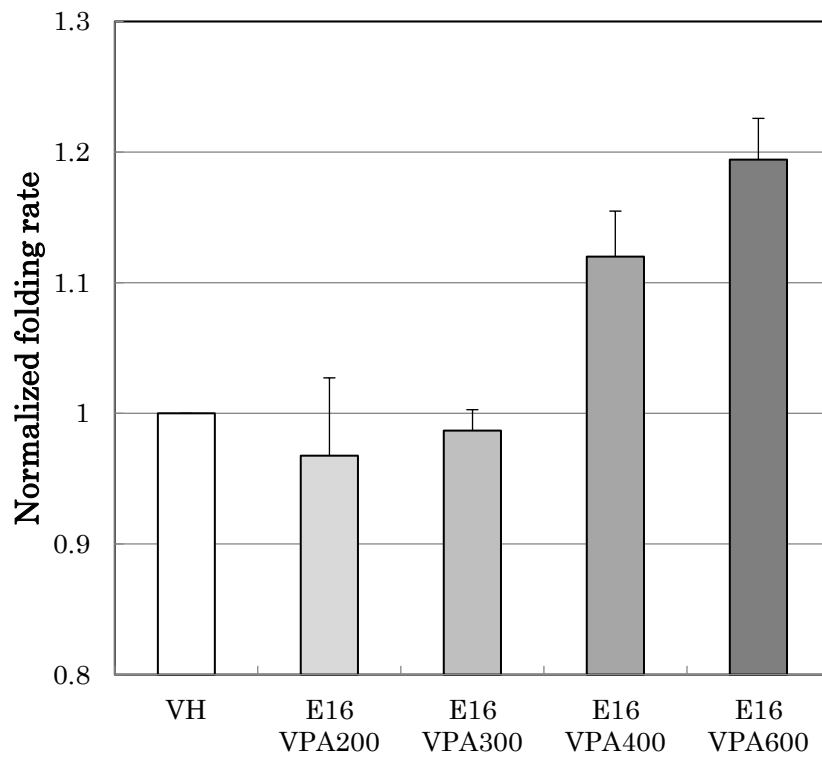
VPA 400 mg/kg 投与動物小脳 (P16)



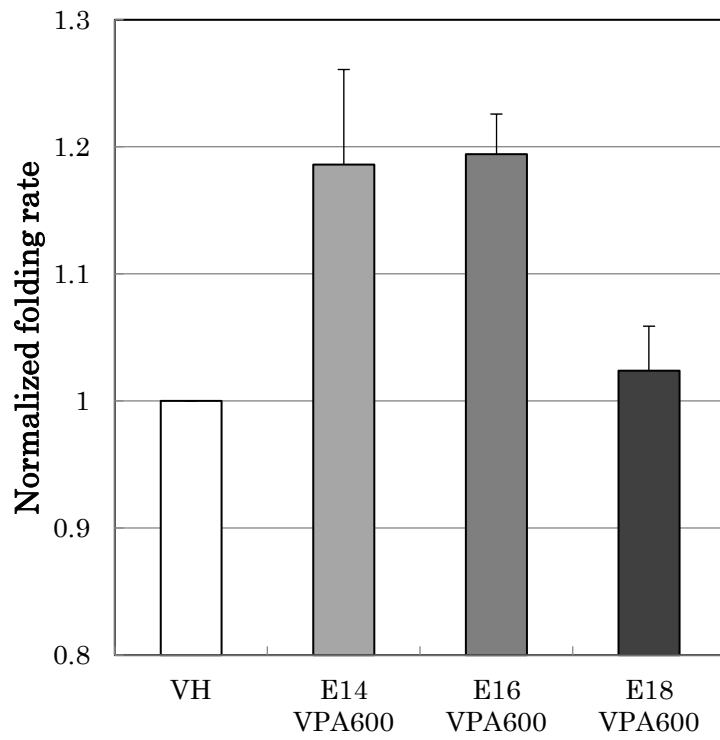
VPA 600 mg/kg 投与動物小脳 (P16)

2-3 VPA の投与濃度(a)、投与時期(b)による小脳虫部の褶曲度の変化

(a)

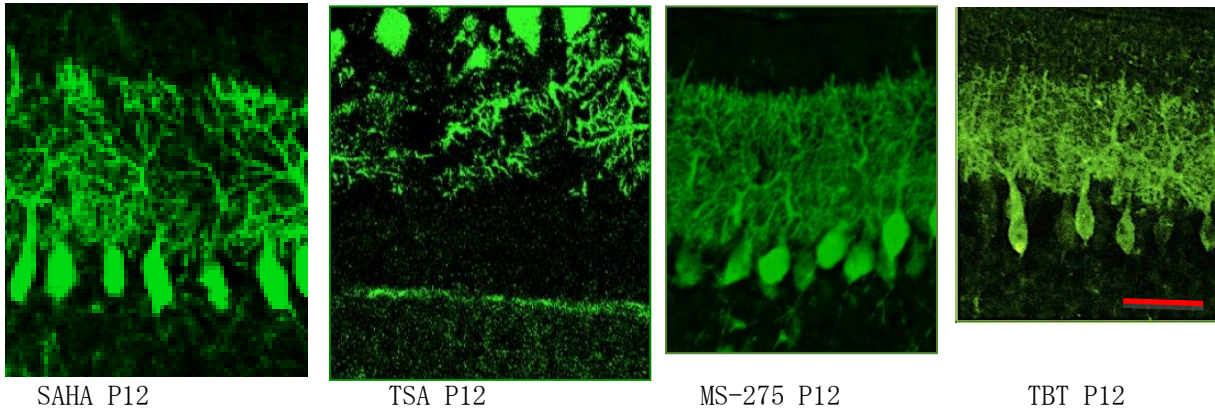


(b)

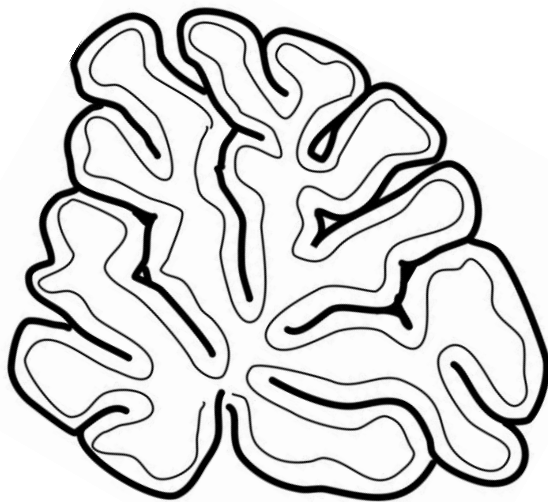


結果 3

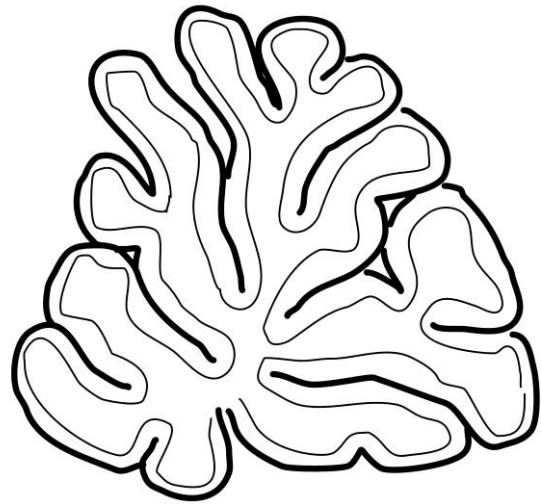
3-1 化学物質投与によるプルキンエ細胞の変化



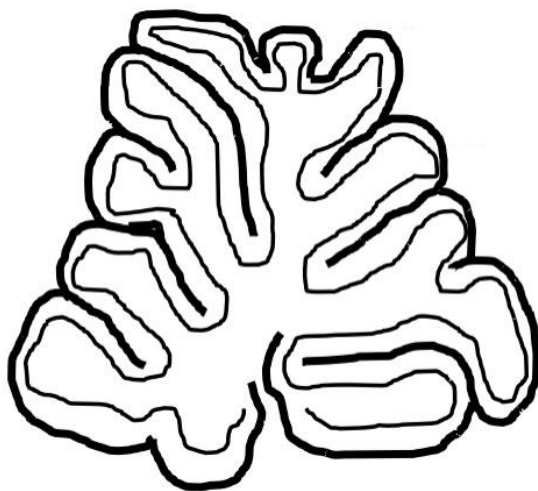
3-2 化学物質投与による小脳小葉褶曲の変化



CPF P14



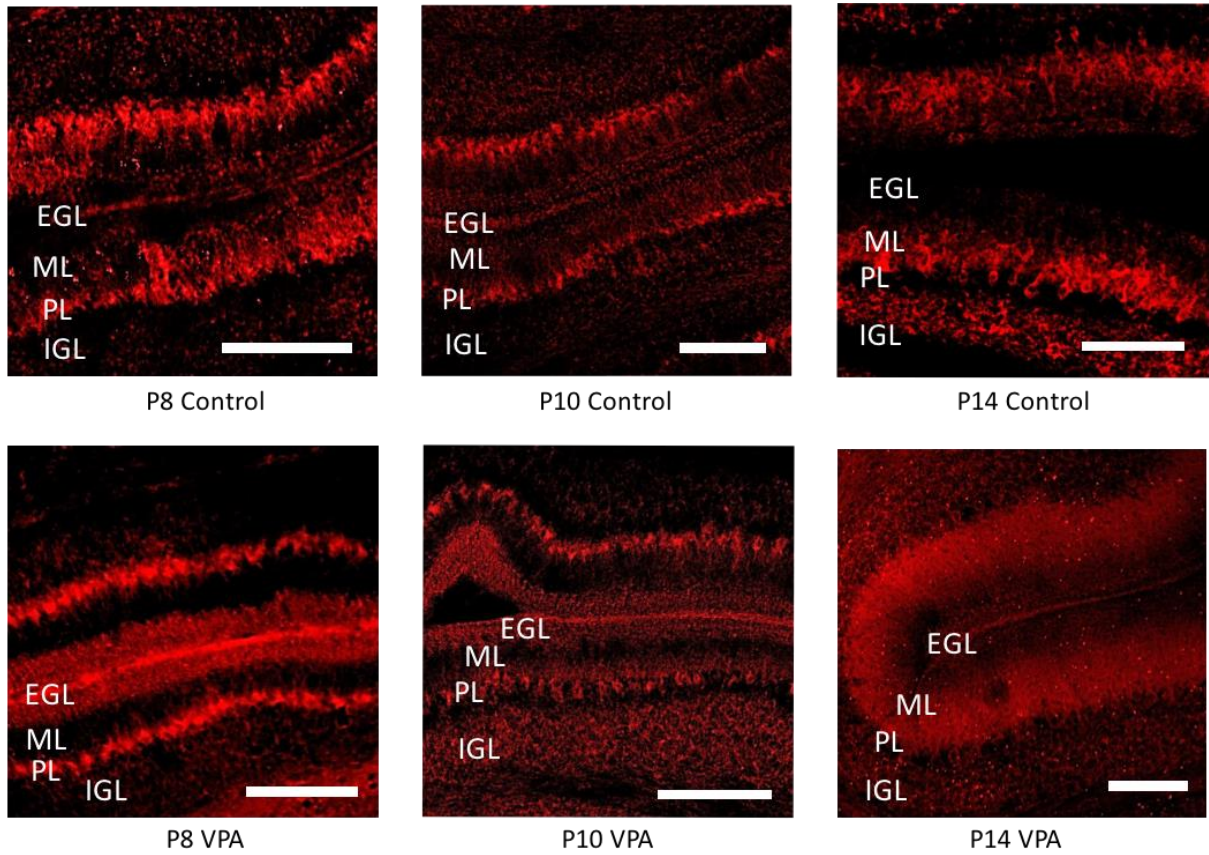
MS-275 P14



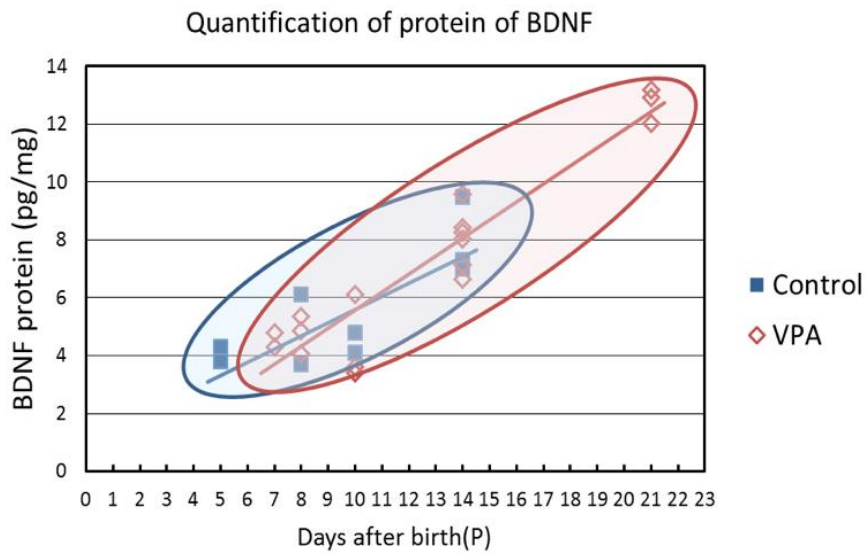
TBT P14

結果 4

4-1 小脳皮質における Reelin の発現

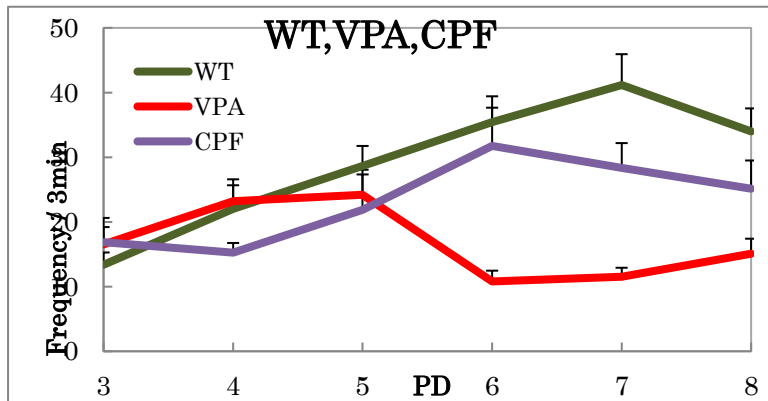


4-2 小脳皮質での BDNF の発現

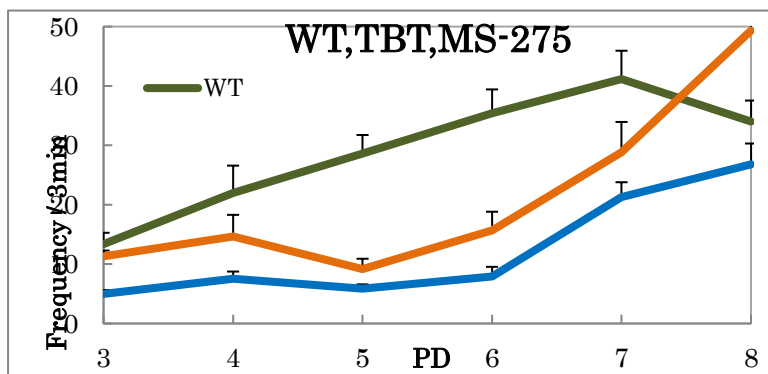


結果 5

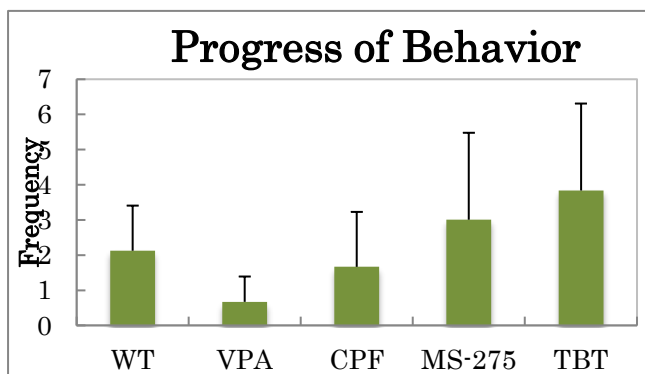
(a)



(b)



(c)



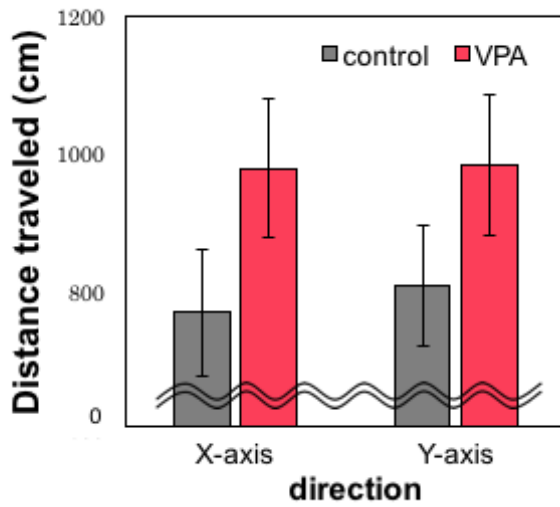
VPA, CPF, TBT, MS-275 投与動物の生後 10 日程度の不随意運動の発生頻度

(a) VPA は対照動物よりも早く不随意運動の低下が見られる。(b) TBT や MS-275 ではむしろ遅くなる。

(c) 運動の頻度変化をしめす。

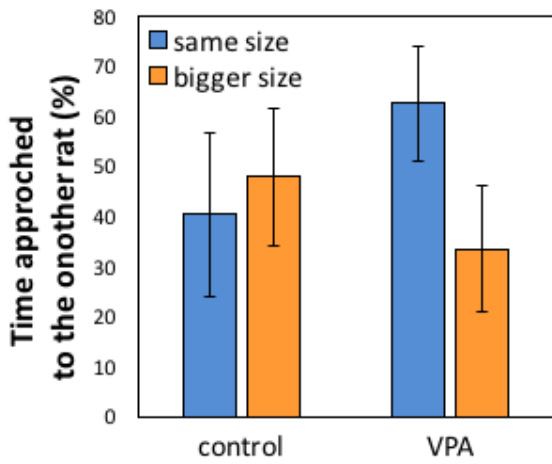
結果 6

6-1 個別行動

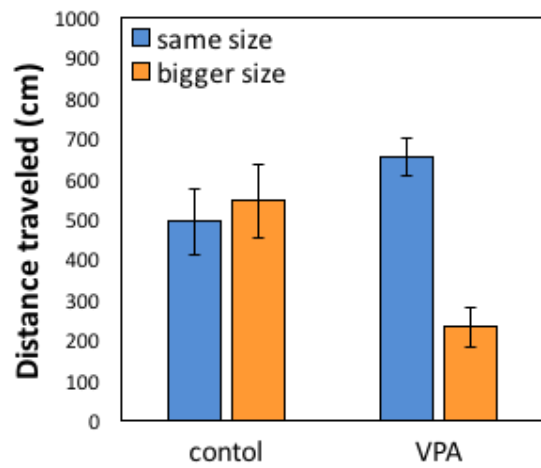


6-2 社会的行動

他ラットへの接近時間

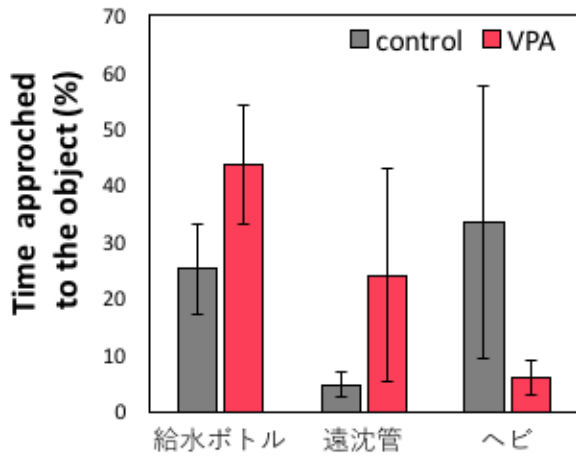


移動距離

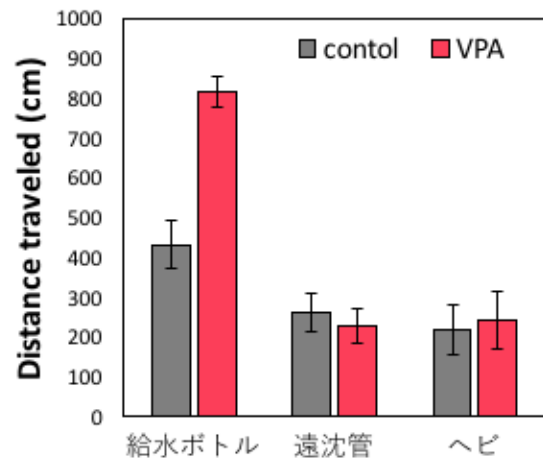


6-3 探索行動

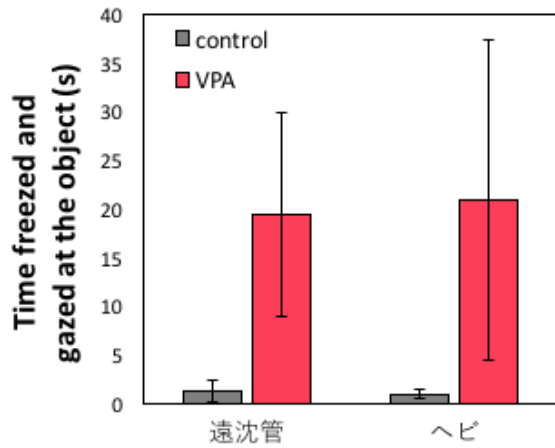
物体への接近時間



移動距離

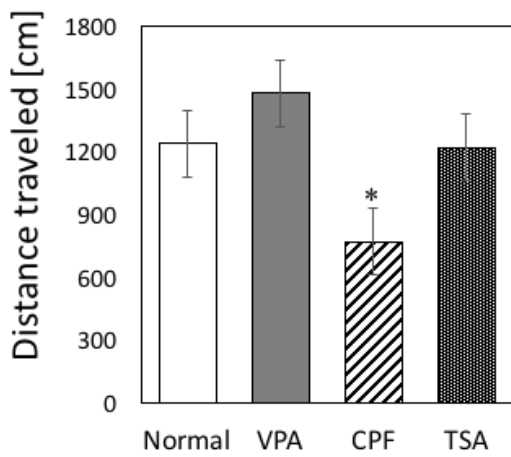


固まって新奇物体を凝視していた時間

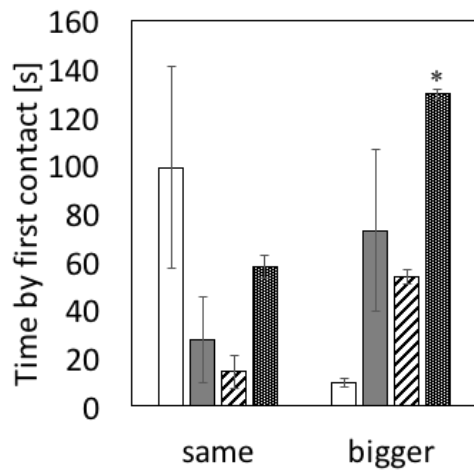


6-4 他の化学物質投与の影響

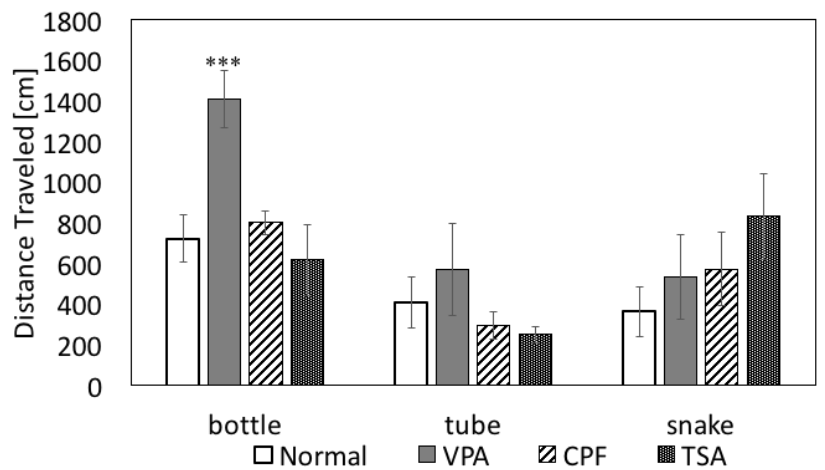
個別行動の移動距離



社会的行動

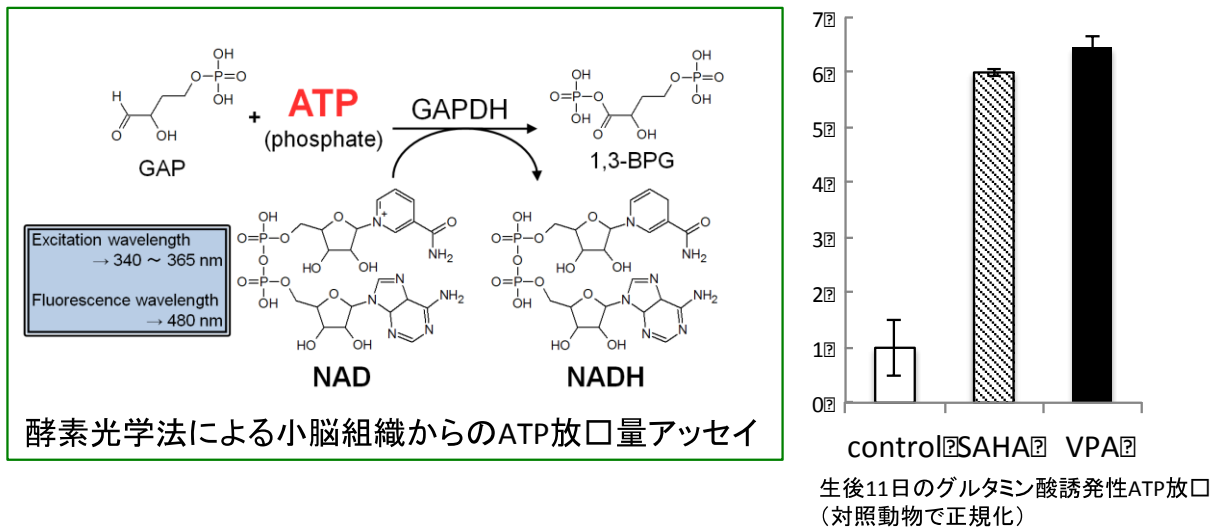


対物行動



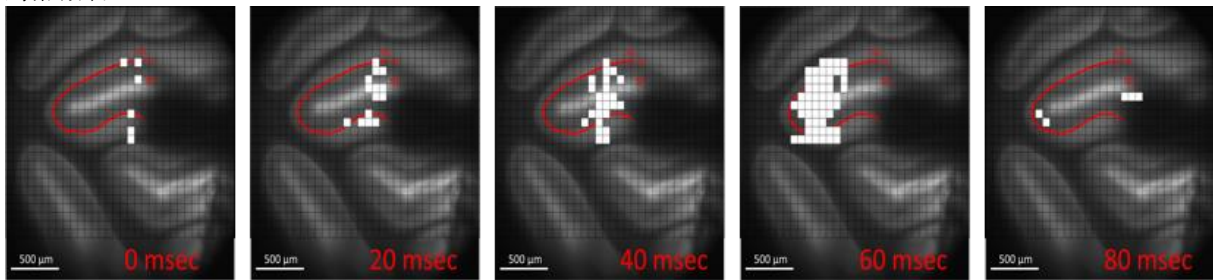
結果 7

(a) 生後 11 日の小脳皮質におけるグルタミン酸誘発性 ATP 放出量の変化

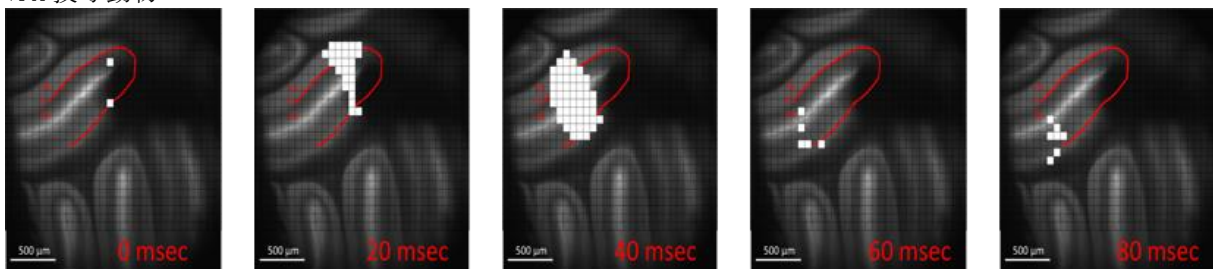


(b) 生後 21 日の小脳皮質における AMPA 刺激 (100mM) によるグルタミン酸放出の時間変化

対照動物



VPA 投与動物



Start
stimulate

Time course

